

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



FERNANDA LIMA SUBRINHO

**ESTUDO PRÉVIO PARA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA: PADRONIZAÇÃO DE
PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO E ADEQUAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ZIDOVUDINA**

**JOÃO PESSOA
2014**

FERNANDA LIMA SUBRINHO

**ESTUDO PRÉVIO PARA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA: PADRONIZAÇÃO DE
PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO E ADEQUAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ZIDOVUDINA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito para a obtenção do grau de
Farmacêutico Generalista.

Orientador: Prof. Pablo Queiroz Lopes

**JOÃO PESSOA
2014**

S941eSubrinho, Fernanda Lima.

Estudo prévio para validação de limpeza: padronização de procedimentos operacionais padrão e adequação de metodologia analítica para quantificação de resíduos de zidovudina/ Fernanda Lima Subrinho.- - João Pessoa: [s.n.], 2014.

49f. : il.

Orientador: Pablo Queiroz Lopes.

**Dedico a todos aqueles que trabalham
em prol da saúde do próximo.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e às minhas irmãs, que me deram todo o incentivo, confiança e liberdade para que eu escolhesse o melhor caminho.

À Gabs, que foi minha família fora de casa. Ohana!

À Suzana, por tudo o que passou e por tudo o que ainda há de vir!

Às minhas primas: Jaciana e Silvana por me recepcionarem tão bem nessa cidade tão bonita, tão grande e tão louca!

A Demóstenes Figueiredo por todo apoio e prestatividade.

Aos meus amigos: Ariela Sales, Carol Cardoso, Ramon Oliveira, Amanda Maritsa, Adriano Alves, Alice Bezerra, Roseana Ramos e Karliene Hozana, vocês são parte dessa história!

Às farmacêuticas: Aíla Santana, Selma Verônica e Amanda Oliveira, assim como à Fernanda Vasconcelos pelas reuniões, norteamentos e toda a ajuda disponibilizada.

À minha preceptora, Sílvia Farias, que sempre me ensinou, incentivou, e algumas vezes acreditou em mim mais do que eu mesma! Muito obrigada!

Ao meu mestre analítico, Júnior Granjeiro.

Ao professor Pablo Queiroz pela amizade, as orientações e a disponibilidade.

À professora Silvana Jales por ser uma grande incentivadora dos nossos sonhos.

Às técnicas da microbiologia: Valéria, Alexandra e Mirian. Por disponibilizarem com tanta prestatividade o espaço e os materiais para as análises microbiológicas.

Ao manipulador João Braga que me acompanhou durante todo o nosso estudo.

Aos demais colaboradores do DILIQ, DIMIC e do COQUA, e a todos os funcionários do LAFEPE, que colaboraram para que eu tivesse dias agradáveis de trabalho.

Aos meus companheiros de jornada, os “Lafepedreiros”: José Izak e Amanda Damasceno, que me acompanharam desde o começo, até aqui. Vocês tornaram esse caminho bem mais fácil!

A Deus, por me abençoar com tantos motivos para agradecer!

Nada há mais poderoso do que uma ideia que chegou no tempo certo.

Victor Hugo

RESUMO

A validação de limpeza faz parte da evolução do conceito de qualidade, e a sua elaboração é essencial para o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, no intuito de oferecer qualidade e segurança aos medicamentos. Antes da validação propriamente dita, é necessário que se desenvolva um estudo prévio que garanta que os procedimentos de limpeza são lógicos e, portanto, aplicáveis à rotina da indústria farmacêutica. O presente trabalho consiste num estudo prévio para validação de limpeza dos equipamentos utilizados na produção do xarope de zidovudina, realizado em colaboração com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, nas instalações da Divisão de Líquidos. Para realização do estudo, os Procedimentos Operacionais Padrão foram atualizados e modificados conforme as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e a seleção da zidovudina como pior caso contaminante foi realizada com base na necessidade do laboratório em validar o processo de limpeza para esse ativo farmacêutico. Foram determinados os limites de aceitação dos resíduos do ativo, e a metodologia analítica de doseamento da zidovudina foi adequada e desafiada quanto à sua aplicabilidade na quantificação dos resíduos após o processo de limpeza. A análise dos resíduos do ativo mostrou que o método analítico é aplicável à validação de limpeza e que o processo de limpeza é eficiente em retirar as sujidades contaminantes. Portanto, os resultados apresentados pelo estudo prévio apresentam a base necessária para o desenvolvimento da validação propriamente dita.

Palavras-chave: Estudo prévio para validação, adequação de metodologia analítica, quantificação de resíduos, zidovudina.

ABSTRACT

The cleaning validation is part of the evolution of quality concept and its preparation is essential for compliance with Good Manufacturing Practices, in order to offer quality and safety to medicines. Before the validation itself, it is necessary to develop a preliminary study to ensure that the cleaning procedures are logical and, therefore, applicable to pharmaceutical industry routine. This work is a previous study to cleaning validation of equipment used in the production of zidovudine syrup, conducted in collaboration with the Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE at Liquids Division facilities. To conduct the study, the Standard Operating Procedures have been updated and modified according the requirements of the National Health Surveillance Agency, and the selection of zidovudine as worst case contaminant was based on the need of the laboratory to validate the cleaning process for this pharmaceutical active. Were determined the waste acceptance limits, and the analytical methodology for zidovudine determination was adequate and challenged as to its applicability in quantifying the waste after the cleaning process. The analysis of the active residues showed that the analytical method is applicable to validation cleaning and the cleaning process is effective to remove contaminating debris Therefore, the results reported by previous study report the necessary basis for the development of validation itself.

Keywords: Previous study to validation, adequacy of analytical methodology, quantification of waste, zidovudine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste de recuperação da água de enxágue em placa de aço inoxidável 316 L	31
Figura 2 – Cromatograma mostrando o tempo de retenção da zidovudina.....	40
Figura 3 – Cromatograma da fase móvel.....	40
Figura 4 – Cromatograma do placebo do xarope de zidovudina.....	41
Figura 5 – Gráfico de regressão linear do método de doseamento de zidovudina.....	42
Figura 6 – Gráfico de regressão linear do método para quantificação dos resíduos de zidovudina.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do xarope de zidovudina e função dos componentes da formulação.....	25
Tabela 2 – Medicamentos fabricados na divisão de líquidos – xaropes, soluções orais e suspensões e demonstração do melhor subsequente.....	29
Tabela 3 – Limites máximos de aceitação obtidos pelo cálculo de dois diferentes métodos.....	30
Tabela 4 – Resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema.....	37
Tabela 5 – Resultados da repetibilidade da zidovudina.....	38
Tabela 6 – Precisão intermediária da zidovudina.....	39
Tabela 7 – Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes para zidovudina.....	39
Tabela 8 – Valores das áreas dos picos de zidovudina obtidos na curva controle.....	44
Tabela 9 – Fator de recuperação para os resíduos de zidovudina.....	44
Tabela 10 – Quantificação do resíduo de zidovudina após a limpeza dos equipamentos.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos testes segundo a sua finalidade.....	22
Quadro 2 – Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	23
Quadro 3 – Modelo de <i>check list</i> para avaliação dos POPs de limpeza da divisão de Líquidos do LAFEPE.....	27
Quadro 4 – Equipamentos da linha de produção de líquidos que foram submetidos à verificação de limpeza.....	28
Quadro 5 – Condições cromatográficas para quantificação da zidovudina.....	32
Quadro 6 – Resultado da avaliação final dos POPs da divisão de líquidos do LAFEPE.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV – Coeficiente de Variação

DPR – Desvio Padrão Relativo

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

POP – Procedimento Operacional Padrão

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RE – Resolução

SQR – Substância Química de Referência

RODAC – *Replicate Organism Detection Counting*

LISTA DE SÍMBOLOS

cm²: centímetros quadrados

g: grama

L: litros

m: metros

mg: miligrama

mL: mililitro

mg/mL: miligrama por mililitro

nº: número

pH: Potencial Hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

R²: Coeficiente de correlação da reta

v/v: volume por volume

µg/mL: micrograma por mililitro

µm: micrometros (micra)

°C: graus Celsius

%: percentual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. Importância das Boas Práticas de produção na prevenção da contaminação- cruzada.....	16
2.2. Validação do método de limpeza	17
2.2.1. Definição de pior caso.....	18
2.2.2. Definição dos limites de aceitação do ativo farmacêutico	19
2.2.3. Técnicas de amostragem	20
2.2.4. Avaliação microbiológica da superfície dos equipamentos	20
2.3. Validação do método analítico	21
2.3.1. Adequação do método.....	23
2.3.2. Adequabilidade do sistema.....	24
2.4. Descrição do processo de produção.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Avaliação do processo de limpeza	27
4.1.1. Definição do agente de limpeza	28
4.1.2. Determinação do pior caso: contaminante e subsequente.....	28
4.1.3. Determinação dos limites de aceitação	29
4.1.4. Teste de recuperação para água de rinsagem	30
4.1.5. Amostragem do resíduo do princípio ativo	31
4.2. Adequação do método de doseamento da zidovudina	32
4.2.1. Amostras, reagentes e preparo das soluções	33
4.2.2. Teste de adequabilidade do sistema	33
4.2.3. Parâmetros avaliados para adequação do método.....	34
4.2.4. Aplicabilidade do método para validação de limpeza.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1. Avaliação dos procedimentos de limpeza	36
5.2. Adequação do método de doseamento da zidovudina	37
5.2.1. Teste de adequabilidade do sistema	37
5.2.2. Avaliação dos parâmetros de adequação do método.....	38
5.4.3. Aplicabilidade do método para validação de limpeza.....	42
5.5. Teste de recuperação da água de rinsagem	43
5.6. Determinação da quantidade de resíduo do princípio ativo	45
6. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF) é um quesito fundamental no Sistema de Garantia da Qualidade industrial e deve ser cumprido para assegurar que os medicamentos estão sendo produzidos de acordo com os padrões exigidos pelas autoridades competentes, ao longo de todo o fluxo produtivo (AMARAL, 2009; BRASIL, 2010a).

Quando aplicado à fabricação de produtos farmacêuticos, um programa apropriado de Garantia da Qualidade deverá assegurar que, dentre outras coisas, exista a validação de metodologias analíticas, de processos, de limpeza e de equipamentos dentro da fábrica de medicamentos (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

A validação faz parte da evolução do conceito de qualidade, onde a prevenção tornou-se primordial e economicamente mais interessante em uma realidade cada vez mais competitiva (YUGUE, 2000). Sabendo disto, as indústrias farmacêuticas adotam um sistema de Garantia da Qualidade buscando a excelência nas suas atividades no intuito de fornecer a seus consumidores produtos qualificados, eficazes e seguros.

Publicada em 2010 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, a RDC nº 17, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos, reconhece que o processo de limpeza representa um aspecto crítico na obtenção da qualidade do produto e que as potenciais fontes de contaminação devem ser eliminadas através de um amplo programa de sanitização.

Para tal propósito, as indústrias farmacêuticas devem desenvolver, validar e documentar todos os processos de limpeza na forma de Procedimentos Operacionais Padrão – POPs, que deverão ser executados por operadores devidamente treinados, de modo a evitar erros e subjetivismos durante o processo (BRASIL, 2010a).

Dentre as responsabilidades contempladas no processo de validação de limpeza existem duas atividades principais: O desenvolvimento e validação do procedimento de limpeza – para remoção de resíduos do ativo, impurezas, produtos de degradação, agentes de limpeza e microrganismos das superfícies dos equipamentos – e o desenvolvimento e validação do método para quantificar os resíduos das superfícies dos equipamentos utilizados na produção (FDA, 1993; MILENOVIC et al, 2008).

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, conta com uma unidade multipropósito para fabricação de formas farmacêuticas líquidas de diversas classes terapêuticas, onde um único medicamento pertencente à classe dos antirretrovirais é produzido: o xarope de zidovudina.

A zidovudina (3'-Azido- 3'- desoxitimidina), possui fórmula molecular $C_{10}H_{13}N_5O_4$, assemelhando-se ao nucleosídeo de timina – de produção endógena – diferenciando-se desta apenas pela presença de um grupo azido (N_3) no anel ribose. (VEAL; BACK, 1995; AOKI, 1999). Apresenta-se sob a forma de um pó cristalino e acastanhado, ligeiramente solúvel em água. E foi o primeiro medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento da infecção pelo vírus HIV 1.

É um fármaco inibidor da transcriptase reversa, e o único antirretroviral com efetividade avaliada para reduzir a transmissão do HIV após a exposição ao vírus, razão pela qual está indicado como parte do esquema de quimioprofilaxia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (OLIVEIRA, 2011).

Para garantir a ausência de resíduos de zidovudina no produto subsequente de uma fábrica multipropósito, faz-se necessário o desenvolvimento de um processo de limpeza eficiente e robusto para redução dos resíduos aos limites aceitáveis propostos por lei, e de um método analítico com sensibilidade e seletividade suficiente para detecção dos resíduos do ativo.

O presente trabalho consiste num estudo prévio para a validação de limpeza dos equipamentos utilizados na produção de zidovudina de modo a garantir a ausência de resíduos contaminantes nos produtos subsequentes da linha produtiva.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância das Boas Práticas de produção na prevenção da contaminação-cruzada

As Boas Práticas de Fabricação compõem a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O cumprimento destas normas está orientado, primeiramente, para a diminuição dos riscos inerentes à produção farmacêutica: a contaminação-cruzada, contaminação por partículas e troca ou mistura de produtos (BRASIL, 2010a).

Um dos maiores perigos e preocupações existentes na área de produção de medicamentos é a contaminação-cruzada de princípios ativos. Isso se deve porque esse tipo de contaminação pode levar à interferência na ação terapêutica dos medicamentos, seja por bloqueio ou por efeito sinérgico entre os princípios ativos envolvidos (ANDRADE, 2012).

Existem vários relatos na literatura sobre efeitos adversos causados pela contaminação-cruzada e de recolhimento de medicamentos devido a falhas no processo de limpeza, o mais recente, noticiado em 2011, trata-se do recolhimento de medicamentos no Brasil, Estados Unidos e Caribe pela empresa Johnson & Johnson[®]. Segundo a empresa o recolhimento estava sendo realizado porque houve casos em que o processo de limpeza dos equipamentos foi insuficiente ou em que a limpeza não foi “documentada adequadamente” (FAGUNDES, 2011).

Para evitar estas não conformidades, os órgãos regulatórios vem aumentando o rigor nas ações preventivas à contaminação-cruzada. Segundo a RDC nº 17 de 2010: os equipamentos não dedicados devem ser limpos de acordo com POP de limpeza validado para evitar esse tipo de contaminação. A resolução acrescenta ainda que nos casos de equipamentos dedicados a validação de limpeza deve considerar resíduos de agentes de limpeza, contaminação microbiológica e produtos de degradação, quando aplicável (BRASIL, 2010a).

2.2. Validação do método de limpeza

A validação de limpeza constitui uma parte das BPF que traz evidências documentadas de que os procedimentos de limpeza aplicados nos equipamentos destinados à produção de medicamentos removem os resíduos a níveis pré-determinados de aceitação (BRASIL, 2010a).

Dentre os passos que devem ser verificados no desenvolvimento de uma validação de limpeza se destacam:

- Existência de procedimentos de limpeza escritos e aprovados;
- Detalhamento dos pontos críticos dos equipamentos e a maneira como cada ponto deve ser limpo;
- Tempos de limpeza, quantidade de solvente utilizado, tipo de solventes, detergentes, e os métodos empregados na limpeza – quantas vezes uma área deve ser esfregada, por quanto tempo e em que sentido.
- Descrição da metodologia de preparação do detergente e padronização do material utilizado na limpeza;
- Definição dos tempos de sujo – por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo antes que a limpeza seja executada, sem alterar a qualidade do processo – e de limpo – por quanto tempo o equipamento pode permanecer limpo, ou seja, ausente de contaminação microbiana, sem que uma nova limpeza tenha que ser executada;

A avaliação dos parâmetros acima é, na verdade, um estudo prévio à validação onde a indústria realiza a revisão do procedimento de limpeza para assegurar que ele seja lógico e que deve ser, portanto, eficaz. É importante que haja essa revisão para que a empresa não despenda de tempo e capital elaborando metodologias de detecção de resíduos e planos de amostragem sem antes avaliar a aplicabilidade dos procedimentos de limpeza (BRASIL, 2006).

Segundo o guia para validação de limpeza da ANVISA (BRASIL, 2006), produtos similares que partilham de procedimentos de limpeza semelhantes podem ser agrupados em um único processo de validação. O guia ressalta ainda que a realização da

validação através do critério de “pior caso” é uma abordagem válida, pois leva em consideração as condições mais críticas em um processo de produção farmacêutica (BRASIL, 2006).

2.2.1. Definição de pior caso

O pior caso é uma situação, às vezes hipotética, onde se estabelece a pior situação que poderia ocorrer em uma linha de produção no que se refere à criticidade da limpeza. O pior caso é formado pelo contaminante – produto manipulado previamente e que poderia vir a contaminar o subsequente na respectiva linha de produção – e pelo subsequente – produto que ao ser contaminado levaria ao paciente a maior dose do contaminante em questão (BRASIL, 2006).

A escolha do pior caso para o qual um determinado procedimento deve ser exposto é vital para que o processo de validação se torne praticável. Nesse contexto, o medicamento que melhor se adequa à categoria de contaminante é aquele que consegue reunir a melhor combinação das seguintes propriedades:

- Menor solubilidade no solvente utilizado no procedimento de limpeza;
- Maior dificuldade de remoção segundo a experiência dos operadores;
- Maior toxicidade;
- Menor dose terapêutica;

Dentre os critérios acima, a principal característica a ser observada no contaminante é a solubilidade: a escolha do produto menos solúvel é requisito suficiente para definição do pior caso (BRASIL, 2006).

O melhor candidato a produto subsequente é aquele que apresenta o menor valor para a razão:

$\frac{\text{Menor tamanho de lote}}{\text{Maior dose terapêutica}}$
--

A indústria também pode adotar um pior caso imaginário. Dessa forma será escolhido um subsequente hipotético que agregue as piores qualidades possíveis. Tal critério serve para construir um estudo de validação de limpeza robusto que suporte a inclusão de novos produtos, assim como, mudança nos tamanhos de lote na rota de fabricação, sem que haja a necessidade da realização de nova validação diante dessas modificações (BRASIL, 2006).

Uma vez que o processo de limpeza esteja validado para o contaminante considerado como pior caso, a limpeza dos demais produtos fabricados na mesma linha de produção também será considerada válida (GOMES; SOUZA, 2010).

2.2.2. Definição dos limites de aceitação do ativo farmacêutico

O limite de aceitação é um dos critérios imprescindíveis do protocolo de validação de limpeza. É um valor numérico real e o seu cálculo leva em consideração: o tamanho do lote, dose do ativo pesquisado, produto subsequente, dados toxicológicos, solubilidade e área de contato do equipamento com o produto.

Os limites devem ser práticos, verificáveis, realizáveis e devem ser definidos através de critérios científicos (HAIDER; ASIF, 2010).

Os Guias Relacionados à Garantia da Qualidade (BRASIL, 2006) especificam três critérios que podem ser usados para determinação dos limites de aceitação, a saber:

- 1- Critério de visualmente limpo: onde nenhum resíduo deve ser visível após a execução do procedimento de limpeza;
- 2- 0,1% da dose limite: critério no qual se permite que não mais que 0,1 % ou a milésima parte da dose diária mínima do contaminante esteja presente na dose diária máxima do subsequente;
- 3- 10 ppm: critério no qual se permite a presença de não mais que 10 ppm do contaminante no produto subsequente.

2.2.3. Técnicas de amostragem

As técnicas de amostragem recomendadas para determinação de resíduos são: amostragem direta da superfície (método do *swab*), e amostragem indireta da superfície (amostras de rinsagem). Para cada técnica existem vantagens e desvantagens de acordo com a sua aplicabilidade.

Na amostragem direta áreas razoavelmente acessíveis podem ser avaliadas e pode ser estabelecido o nível de contaminação por área. Por outro lado, não pode ser aplicado em áreas inacessíveis e a própria amostragem pode induzir a contaminação do equipamento (OLIVEIRA, 2011).

A amostragem por rinsagem permite a amostragem de grandes áreas e também de áreas de difícil acesso, como sistemas que não podem ser rotineiramente desmontados: bicos de envase, tubulações e pequenas peças. No entanto, o resíduo precisa ser solúvel no solvente utilizado e deve-se levar em consideração o risco de o contaminante encontrar-se aderido em alguma superfície, de modo que a simples rinsagem não seja capaz de retirá-lo (BRASIL, 2006).

Seja qual for a técnica de amostragem escolhida deve-se verificar os níveis de recuperação possíveis, determinar sua reprodutibilidade e exatidão em conjunto com o método analítico aplicado (MINGORANCE, 2005).

2.2.4. Avaliação microbiológica da superfície dos equipamentos

Além da contaminação-cruzada, outro fator potencial para adulterar a qualidade do medicamento é a contaminação microbiológica, que muitas vezes acontece mesmo que a limpeza tenha sido realizada de forma efetiva (ANDRADE, 2012). Um dos fatores que contribui para ocorrência da contaminação microbiológica é o armazenamento do equipamento em condições de umidade não controladas ou contendo água no seu interior, favorecendo o crescimento de microrganismos.

O risco da contaminação microbiana de medicamentos está na capacidade que o microrganismo possui de promover o processo de deterioração do produto farmacêutico.

Esses contaminantes produzem enzimas degradativas que podem agir sobre o medicamento levando à diminuição da potência do princípio ativo, à redução da biodisponibilidade, à formação de pigmentos, odores e toxinas, e ainda, à degradação do próprio sistema conservante da formulação farmacêutica (MAGESTE et al, 2012; SILVA, G. T., 2012).

Uma área fundamental na indústria farmacêutica é o controle de qualidade microbiológico, que é responsável pelo estudo dos microrganismos contaminantes associados à produção de medicamentos. A contaminação microbiológica torna-se um problema quando os microrganismos estão presentes no ambiente e nos equipamentos de fabricação acima dos níveis aceitáveis pelo órgão sanitário.

A preocupação em evitar a presença de microrganismos acima dos níveis aceitáveis diz respeito tanto a produtos farmacêuticos estéreis como não estéreis e, por isso, o controle microbiológico está envolvido na compreensão da probabilidade do aumento de contaminações do produto, procurando formas eficientes de minimizá-las (FONSECA, 2012).

O monitoramento microbiano de superfície deve ser realizado para avaliar a eficácia das práticas de limpeza e desinfecção de equipamentos. Para esse propósito, os equipamentos são avaliados logo após a finalização de todo o processo de limpeza e a amostragem é feita utilizando-se placas de contato - RODAC *plates*, *swabs* e água de lavagem.

2.3. Validação do método analítico

O controle da efetividade da limpeza dos ativos farmacêuticos deve ser realizado através de um método analítico seletivo para a determinação da substância em estudo e que apresente sensibilidade suficiente, visto que, em geral, as contaminações presentes após o processo de limpeza são encontradas em concentrações muito baixas (KLINKENBERG; STREEL; CECCATO, 2003).

Para tanto, a metodologia analítica empregada nos estudos de validação de limpeza deve ser criteriosamente elaborada e validada para tal atividade, pois ela assegura que as análises executadas forneçam os resultados com confiabilidade em função do método ou do procedimento utilizado (PERES, 2010).

Segundo a USP 36, validação de metodologia analítica é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, que as características de performance do método apresentam os requisitos necessários para aplicação analítica pretendida.

A validação dos procedimentos analíticos demonstra que os métodos de ensaio utilizados são consistentes e apresentam resultados que permitem avaliar a qualidade dos medicamentos, conforme parâmetros especificados (BRASIL, 2012).

A RE nº 899 de 2003 define que: no caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

A legislação divide os testes em quatro categorias segundo a sua finalidade, e os parâmetros de validação a serem seguidos estão relacionados com a categoria do teste escolhido. Os quadros 1 e 2 apresentam a classificação dos testes e os ensaios necessários para a validação.

No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centros de estudo de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade, e linearidade (BRASIL, 2003).

Quadro 1- Classificação dos testes segundo a sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance
IV	Testes de identificação

Quadro 2- Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	SIM	SIM	SIM	*	SIM
Linearidade	SIM	SIM	NÃO	*	NÃO
Intervalo	SIM	SIM	*	*	NÃO
Precisão Repetibilidade	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Precisão intermediária	**	**	NÃO	**	NÃO
Limite de detecção	NÃO	NÃO	SIM	*	NÃO
Limite de quantificação	NÃO	SIM	NÃO	*	NÃO
Exatidão	SIM	SIM	*	*	NÃO
Robustez	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

2.3.1. Adequação do método

De acordo com a RE nº 899 de 2003, quando a metodologia analítica estiver descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, ela será considerada validada.

No entanto, quando um laboratório deseja utilizar uma metodologia analítica já descrita, é necessário verificar a sua adequação nas condições atuais de uso, e, para essa finalidade, alguns dos parâmetros da validação do método analítico são escolhidos e avaliados. Pois, o laboratório deve confirmar que possui competência necessária para

aplicar o método de modo apropriado, e que atinge o pretendido e opera bem sob as condições normais de uso (DOQ-CGCRE-008-INMETRO, 2011).

Sendo assim, a adequação ou verificação do método é a evidência documentada de que um método previamente validado desempenha como pretendido no ambiente em que está sendo aplicado (BRASIL, 2012).

2.3.2. Adequabilidade do sistema

Vários métodos analíticos tem sido aplicados para verificar o sucesso das operações de limpeza, dentre eles, os desenvolvidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência são os mais comumente descritos pela literatura (OLIVEIRA, 2011).

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida, e são aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas (BRASIL, 2010b).

Os principais parâmetros para a verificação da adequabilidade do sistema são descritos a seguir:

- Resolução (R): é função da eficiência da coluna. É especificada para garantir que substâncias eluídas em tempos de retenção próximos apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas;
- Desvio Padrão Relativo (DPR): verifica se os requerimentos da precisão foram atingidos através da injeção de replicatas da solução padrão trabalhadas estatisticamente. São utilizados os dados de cinco replicatas de injeções para calcular o DPR, que deve apresentar valor igual ou inferior a 2%;
- Fator de calda (T): indica a simetria do pico. Segundo a Farmacopeia brasileira, é igual a 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria. Já para a farmacopeia portuguesa, o fator de simetria está compreendido entre 0,8 e 1,5, salvo indicação contrária da monografia (PORTUGAL, 2005).

2.4. Descrição do processo de produção

A divisão de líquidos do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE – é composta por duas unidades produtivas distintas: a fábrica de antibióticos – área exclusiva para produção de medicamentos antimicrobianos – e uma outra unidade produtiva que abrange a linha de soluções orais e a linha rotativa, esta última consiste numa unidade multipropósito onde um único medicamento da classe dos antirretrovirais é produzido: o xarope de zidovudina.

O processo de produção da zidovudina na forma farmacêutica xarope ocorre da seguinte maneira: Primeiramente, todos os componentes da fórmula são pesados, em seguida, adiciona-se parte da água purificada no tanque/reator de material inox com capacidade para 5000 L, munido de agitador mecânico. Na sequência são adicionados os demais componentes e o volume do reator é completado para 5000 L com água purificada.

O produto final é filtrado em membrana de 10 µm e, após as análises do controle de qualidade em processo – teor, pH e viscosidade – e do controle microbiológico, o produto é envasado em frasco âmbar de 200 mL.

A tabela 1 apresenta a formulação do produto e a função de cada componente.

Tabela 1 – Composição do xarope de zidovudina e função dos componentes da formulação.

Matéria-prima	Função do componente na formulação
Zidovudina	Princípio ativo
Benzoato de sódio	Conservante
Açúcar	Edulcorante
Glicerina	Agente solubilizante
Essência de morango	Edulcorante
Ácido cítrico	Antioxidante
Água purificada	Veículo

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar um estudo prévio para a validação de limpeza dos equipamentos envolvidos na fabricação do xarope de zidovudina LAFEPE.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os procedimentos operacionais padrão de limpeza dos equipamentos e modificá-los, conforme as necessidades, segundo os Guias Relacionados à Garantia da Qualidade da ANVISA (BRASIL, 2006);
- Definir os limites de aceitação para os resíduos contaminantes do ativo farmacêutico;
- Realizar a adequação da metodologia analítica para quantificação do ativo;
- Verificar se o método é aplicável para quantificação dos resíduos do ativo após a realização da limpeza;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Avaliação do processo de limpeza

O primeiro passo de um estudo de validação de limpeza é a revisão dos Procedimentos Operacionais Padrão, de modo a avaliar se o procedimento de limpeza é lógico e, portanto, eficaz (BRASIL, 2006).

Para adequar-se às orientações da ANVISA, foi criado um modelo de *check list* (Quadro 3) baseado nos Guias Relacionados à Garantia da Qualidade. Através do preenchimento do *check list* foi possível observar onde cada POP deveria ser modificado e melhorado.

Quadro 3 – Modelo de *check list* para avaliação dos POPs de limpeza da divisão de Líquidos do LAFEPE.

REQUISITOS EXIGIDOS	A.T.	A.P.	N.A.
Existe procedimento de limpeza escrito, aprovado e com seus respectivos registros de treinamento anexados.			
Somente funcionários treinados podem executar o processo de limpeza.			
O procedimento detalha pontos críticos dos equipamentos e a maneira como cada ponto deste deve ser limpo.			
Existem códigos de identificação para os vários pontos críticos de limpeza.			
O procedimento detalha os tempos, quantidade de solvente utilizado, tipo de solventes e tipo de detergente.			
O procedimento detalha o método de limpeza (quantas vezes uma determinada área deve ser esfregada, por quanto tempo e em que sentido).			
O material utilizado é padronizado (o procedimento detalha a metodologia de preparação do detergente e estabelece sua concentração de uso).			
O procedimento define por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo, antes que a limpeza seja executada.			
O procedimento define por quanto tempo o equipamento pode permanecer limpo, antes que a limpeza seja executada.			

Legenda: AT: atende; AP: atende parcialmente; NA: Não atende.

A linha de produção de líquidos é constituída por equipamentos utilizados no processo de manipulação, envase e rotulagem. Os equipamentos utilizados na manipulação do xarope de zidovudina são partilhados com as demais formas farmacêuticas produzidas no setor: suspensões e soluções orais.

O quadro 4 apresenta a identificação dos equipamentos que foram utilizados para realização do estudo prévio da validação de limpeza.

Quadro 4 – Equipamentos da linha de produção de líquidos que foram submetidos à verificação de limpeza.

TAG	EQUIPAMENTOS	LOCALIZAÇÃO
21BRC005	Bomba centrífuga nº 4	Área de manipulação de líquidos – xarope, soluções orais e suspensões.
21RTA101	Reator 5000 L	Área de manipulação de líquidos – xarope, soluções orais e suspensões.
----	Mangueira de 17 m	Área de manipulação de líquidos – xarope, soluções orais e suspensões.
----	Mangueira de 5 m	Área de manipulação de líquidos – xarope, soluções orais e suspensões.

FONTE: Divisão de Líquidos do LAFEPE.

4.1.1. Definição do agente de limpeza

Para a execução da limpeza dos equipamentos, foi utilizado o Extran[®] MA 02 neutro, produzido pela Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). Trata-se de um detergente indicado para limpeza manual de equipamentos, solúvel em água (20 °C), de pH 7,5 e densidade 1,07 g/cm³. Composto por sais sódicos do ácido benzenosulfônico (tensoativo aniônico), álcool etoxilado (tensoativo não iônico) e sais de trietanolamina (tensoativo anfótero) (MERCK, 2012).

4.1.2. Determinação do pior caso: contaminante e subsequente

O critério de escolha da zidovudina como medicamento contaminante deveu-se à necessidade do LAFEPE em validar o processo de limpeza para esse ativo farmacêutico, de modo a constatar a ausência de resíduos de zidovudina nos produtos subsequentes.

Uma vez escolhido o contaminante, deve-se escolher o melhor subsequente, pela observação de qual medicamento, dentre todos os produzidos na área (exceto o contaminante), apresenta o menor valor para a razão:

$$\frac{\text{Menor tamanho de lote}}{\text{Maior dose terapêutica}}$$

Observando os resultados da tabela 2, concluímos que o medicamento que melhor se encaixa na categoria de subsequente é o mebendazol.

Tabela 2 – Medicamentos fabricados na divisão de líquidos – xaropes, soluções orais e suspensões e demonstração do melhor subsequente.

Produto	Concentração	Volume	Maior Dose Terapêutica - MDT	Tamanho do lote – TL	Razão TL/MDT
Polivitaminas	7,49 mg/mL*	150 mL	15 mL	5000 L	333.333
Salbutamol	0,4 mg/mL	120 mL	40 mL	5000 L	125.000
Hidróxido de Alumínio	62 mg/mL	150 mL	40 mL	5000 L	125.000
Mebendazol	20 mg/ mL	30 mL	20 mL	2000 L	100.000
Sulfato Ferroso	25 mg/ mL**	30 mL	8 mL	2000 L	250.000

(*) De vitamina C, (**) De ferro elementar. FONTE: Memento terapêutico LAFEPE, 2006.

4.1.3. Determinação dos limites de aceitação

Os limites máximos aceitáveis de zidovudina como potencial contaminante foram calculados pelos dois diferentes critérios indicados pelo Guia de validação de limpeza (2006): 0,1% da dose limite e 10 ppm do contaminante no produto subsequente.

Pela observação dos resultados mostrados na tabela 3, percebe-se que os valores limites foram os mesmos para ambos os critérios aplicados, e que eles ultrapassam o máximo valor aceitável – de 10 ppm – determinado pela ANVISA.

Segundo OLIVEIRA, 2011: a redução dos limites de aceitação pode ser ilimitada, pois, a adoção de critérios mais rígidos garante que uma menor dose do contaminante estará presente no produto subsequente. Sabendo disto, adotamos o limite analítico de 2,5 µg/ mL para os resíduos de zidovudina presentes nos equipamentos após o processo de limpeza.

Tabela 3 – Limites máximos de aceitação obtidos pelo cálculo de dois diferentes métodos.

Critério	Limite de aceitação
0,1 % da dose limite	100,00 µg/mL
10 ppm	100,00 ppm
Limite adotado	2,5 µg/mL

4.1.4. Teste de recuperação para água de rinsagem

A técnica de amostragem utilizada para extração do resíduo do ativo foi o método de rinsagem (ou água de enxágue), tendo em vista que a solubilidade da zidovudina em água está na ordem de 25mg/mL, superior à própria concentração do produto final na forma de xarope que é de 10 mg/mL (ALENCAR et al, 2006).

Porém, antes de realizar a amostragem nos equipamentos, é necessário desafiar o método de amostragem a fim de demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados da superfície dos equipamentos e demonstrar o nível de recuperação – porcentagem do resíduo que pode ser recuperada do meio em que está aderido – e a sua consistência – dispersão dos valores para amostragens repetidas sob as mesmas condições.

Para o estudo de recuperação, deve-se, inicialmente, preparar a solução do contaminante. Para isso foram pesados 125 mg de zidovudina, que foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, que teve seu volume completado com água ultrapurificada (Solução mãe a 1,25 mg/mL). Da solução mãe foi transferido 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume do balão com água ultrapurificada (Solução contaminante, concentração 12,5 µg/mL).

Posteriormente, contaminaram-se seis placas de aço inoxidável 316L de 25cm², com 1 mL da solução contaminante de zidovudina, deixando-as secar à temperatura ambiente. Depois que todo solvente evaporou das placas, cada uma delas foi posicionada na vertical, dentro de um béquer, em seguida 5 mL da solução de extração (água ultrapurificada) foram lançados sobre as placas com o auxílio de uma pipeta volumétrica (Figura 1).

Figura 1 – Teste de recuperação da água de enxágue em placa de aço inoxidável 316L.



Fonte: SUBRINHO, F. L.

As placas foram retiradas e as soluções contidas nos béqueres foram filtradas em membranas de 0,45 μm , transferidas para os *vials* e analisadas por CLAE. A quantificação de cada recuperação foi feita em comparação com a curva de linearidade do método analítico, cujo centro corresponde ao limite de aceitação de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de zidovudina.

Por fim, foi encontrado o valor do fator de recuperação por meio da fórmula:

$$F_{\text{rec.}} = \text{Amostra} / \text{Padrão} \times 100$$

Onde:

$F_{\text{rec.}}$ = Fator de Recuperação

Amostra = área do pico da amostra

Padrão = média das áreas dos picos da curva de linearidade (2,5 $\mu\text{g/mL}$).

4.1.5. Amostragem do resíduo do princípio ativo

A amostragem do princípio ativo foi realizada após a produção de um lote do xarope de zidovudina. Foi realizada a limpeza dos equipamentos e a verificação do critério de visualmente limpo. Utilizou-se 200 litros de água para a rinsagem, e três amostras de 400 mL foram retiradas em frascos de vidro esterilizados.

As amostras coletadas foram filtradas em membranas de 0,45 μm , transferidas para os *vials* e analisadas por CLAE. De posse da curva de linearidade do método analítico, obteve-se a concentração equivalente de cada amostra.

4.2. Adequação do método de doseamento da zidovudina

Para quantificação do resíduo do princípio ativo zidovudina, foi utilizada a metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida, descrita na Farmacopeia Brasileira, 2010 (BRASIL, 2010).

Como se trata de um método oficial e, portanto, validado segundo a RE nº 899 de 2003, realizou-se a verificação da sua adequação nas condições atuais de uso no Laboratório de Controle de Qualidade do LAFEPE.

Para isso, foi utilizado o aparelho de CLAE pertencente ao Controle de Qualidade (COQUA) da marca HITACHI®, modelo VWR Chromaster, certificado pela Merck® e TAG 32CLA004. As condições cromatográficas para quantificação da zidovudina estão resumidas no quadro 5.

Quadro 5 – Condições cromatográficas para quantificação da zidovudina.

Características	Descrição
Fase Estacionária	Coluna LiChroCART RP-C18 (4 x 250 mm - 5 μm)
Fase Móvel	Metanol / Água (20:80)
Fluxo	1,2 mL/min.
Volume de injeção	10 μL
Tempo de corrida	20 minutos
Temperatura	25° C
Detector	UV 265 nm

4.2.1 Amostras, reagentes e preparo das soluções

O padrão primário utilizado na preparação das soluções padrão foi a zidovudina, padrão INCQS, lote 1023, fabricado pela Fiocruz/INCQS. E para a preparação das amostras, utilizou-se a zidovudina matéria-prima, lote 17220, fabricada pela Zhejiang Xinhua pharmaceutical.

Para a solução de resolução, a substância química de referência foi a impureza B (ou substância relacionada B) padrão USP. O metanol utilizado foi de grau HPLC e a água ultrapurificada foi obtida em aparelho de filtração MILI-Q.

A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol e água na proporção de 20:80, e o diluente das amostras foi a própria fase móvel. Para a preparação da solução padrão foram pesados 20 mg de zidovudina SQR e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, que teve seu volume completado com fase móvel, resultando na solução padrão a 0,2 mg/mL. A solução amostra foi preparada a partir de 50 mg de zidovudina dissolvidos em fase móvel num balão volumétrico de 50 mL para obter solução a 1mg/mL. Depois, transferiu-se 10 mL dessa solução para outro balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com fase móvel, obtendo solução a 0,2 mg/mL.

4.2.2. Teste de adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi realizada com a injeção de 10 µL da solução de resolução, preparada pela transferência de 5 mg da impureza B para um balão volumétrico de 50 mL, seguida da adição de 25 mL da solução padrão. O volume final foi completado com fase móvel.

4.2.3. Parâmetros avaliados para adequação do método

Para a adequação do método às condições atuais de uso do laboratório de controle de qualidade do LAFEPE foram avaliados os parâmetros de: precisão, especificidade e linearidade.

1. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Podendo ser avaliada em três níveis:

- ✓ **Repetibilidade** (precisão intra-corrida) – consiste na determinação de uma amostra repetidas vezes sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo.
- ✓ **Precisão intermediária** - concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- ✓ **Reprodutibilidade** – refere-se à precisão entre laboratórios.

Segundo a Resolução vigente, a precisão de um método analítico deve ser expressa em desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação - CV%), não se admitindo valores superiores a 5%.

A repetibilidade do método foi verificada com 6 (seis) determinações a 100% da concentração do teste e para a precisão intermediária, as amostras foram preparadas no mesmo laboratório, mas as análises foram realizadas em dias diferentes por analistas diferentes.

2. Especificidade / Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A seletividade do pico de zidovudina foi verificada frente à fase móvel e ao placebo do xarope de zidovudina nas mesmas condições cromatográficas.

3. Linearidade

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado.

A linearidade da resposta do detector do HPLC para este método foi determinada analisando 7 (sete) diferentes concentrações (50%; 80%; 90%; 100%; 110%; 120% e 150%) do insumo farmacêutico ativo zidovudina.

Para essa finalidade foram preparadas soluções-mãe em triplicata e cada solução-mãe originou uma curva de linearidade. As três curvas foram tratadas por Análise de Variância (ANOVA), para obtenção da equação da reta.

4.2.4. Aplicabilidade do método para validação de limpeza

No intuito de verificar se o método analítico é aplicável para quantificação dos resíduos do ativo após a realização da limpeza, foi construída uma curva de linearidade, através da análise de 7 (sete) concentrações diferentes da solução padrão de zidovudina (50%; 80%; 90%; 100%; 110%; 120% e 150%), cujo centro correspondia ao limite máximo adotado para o contaminante (2,5 µg/mL). Foram preparadas soluções-mãe em triplicata e cada solução-mãe originou uma curva de linearidade. As três curvas foram tratadas por Análise de Variância (ANOVA), para obtenção da equação de reta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação dos procedimentos de limpeza

Após o preenchimento do *check list*, apresentado no quadro 3, foi possível observar onde cada POP deveria ser modificado e melhorado.

As modificações necessárias foram realizadas e os procedimentos passaram a atender às recomendações descritas no guia de validação de limpeza, como pode ser observado a partir da análise do quadro 6.

Quadro 6 – Resultado da avaliação final dos POPs da divisão de líquidos do LAFEPE.

REQUISITOS EXIGIDOS	A.T.	A.P.	N.A.
Existe procedimento de limpeza escrito, aprovado e com seus respectivos registros de treinamento anexados.	X		
Somente funcionários treinados podem executar o processo de limpeza.	X		
O procedimento detalha pontos críticos dos equipamentos e a maneira como cada ponto deste deve ser limpo.	X		
Existem códigos de identificação para os vários pontos críticos de limpeza.	X		
O procedimento detalha os tempos, quantidade de solvente utilizado, tipo de solventes e tipo de detergente.	X		
O procedimento detalha o método de limpeza (quantas vezes uma determinada área deve ser esfregada, por quanto tempo e em que sentido).	X		
O material utilizado é padronizado (o procedimento detalha a metodologia de preparação do detergente e estabelece sua concentração de uso).	X		
O procedimento define por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo, antes que a limpeza seja executada.	X		
O procedimento define por quanto tempo o equipamento pode permanecer limpo, antes que a limpeza seja executada.	X		

Legenda: AT: atende; AP: atende parcialmente; NA: Não atende.

Para tornar os procedimentos mais fáceis de serem compreendidos, foram adicionadas ilustrações, fotografias e esquemas apontando a maneira de limpar os equipamentos, bem como, os pontos críticos e a identificação de cada parte deles.

5.2. Adequação do método de doseamento da zidovudina

5.2.1. Teste de adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi realizada com a injeção de 6 (seis) replicatas de 10 µL da solução de resolução, e a partir dos resultados das corridas analíticas foram analisados os seguintes parâmetros: tempo de retenção, pratos teóricos, resolução, fator de calda e desvio padrão relativo - DPR (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema.

Nome	Tempo de retenção	Pratos teóricos (USP)	Resolução (USP)	Fator de calda	DPR
Zidovudina	13,04	6176	8,54	1,21	0,27
Impureza B	15,34	6979	3,29	1,17	0,03

A análise dos parâmetros fator de calda, resolução e tempo de retenção, mostra picos simétricos, bem resolvidos e com tempos de retenção definidos para a zidovudina e para a impureza B.

A reprodutibilidade do sistema cromatográfico mostra-se adequada para as análises, com valores de DPR menores que o especificado pela literatura (2%). E a eficiência da coluna é comprovada pelo número de pratos teóricos, que apresentam valores acima de 2000.

5.2.2. Avaliação dos parâmetros de adequação do método

1. Precisão

1.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada utilizando-se 6 (seis) amostras a 100% da solução de zidovudina (0,2 mg/mL), sob as mesmas condições de teste, em um curto intervalo de tempo e preparadas pelo mesmo analista.

Pela análise da tabela 5, observa-se que a repetibilidade atende a resolução vigente, visto que o coeficiente de variação 0,77% para zidovudina está inferior ao valor máximo aceitável de 5%.

Tabela 5 – Resultados da repetibilidade da zidovudina.

Amostra	% Zidovudina
1	99,8
2	99,4
3	98,3
4	98,3
5	98,7
6	97,5
Média	98,66
DP	0,76
CV%	0,77

1.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada utilizando-se 4 (quatro) amostras a 100% preparadas por um segundo analista, nas mesmas condições de teste da repetibilidade. Nas tabelas 6 e 7, seguem os resultados da precisão intermediária e teste t *Student*, respectivamente.

Tabela 6 – Precisão intermediária da zidovudina.

Amostra	% Zidovudina	
	Analista-1	Analista-2
1	98,26	98,79
2	98,32	97,66
3	98,68	98,45
4	97,49	99,05
Média	98,19	98,49
DP	0,50	0,60
CV%	0,51	0,61

Tabela 7 – Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes para zidovudina.

	Zidovudina	
	Analista-1	Analista-2
Analista		
Media	98,19	98,49
Variância	0,25	0,36
Star T	0,77	
P(T<=t) bi-caudal	0,47	
t crítico bi-caudal	2,45	

Estatisticamente, para a repetibilidade foram apresentados valores de coeficientes de variação inferiores a 5% e com 95% de confiança. Para a precisão intermediária, após aplicação dos testes *t Student*, o *t* calculado para zidovudina foi de 0,77, valor inferior ao *t* tabelado de 2,45, com 95% de confiança. Portanto, o método foi preciso.

2. Especificidade / seletividade

A seletividade do pico de zidovudina (Figura 2) foi verificada pela injeção de amostras da fase móvel (Figura 3) e do placebo do xarope de zidovudina (Figura 4). A análise das figuras mostra que durante a corrida cromatográfica não houve detecção referente à fase móvel nem ao placebo do xarope no tempo de retenção da zidovudina.

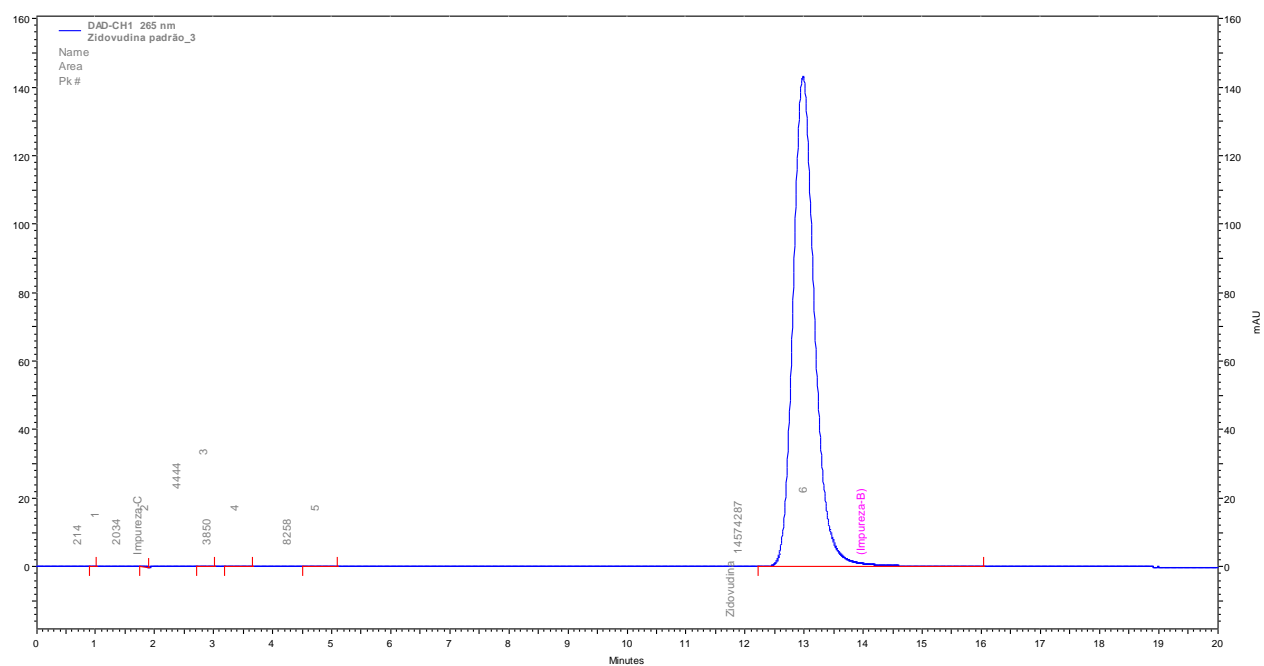
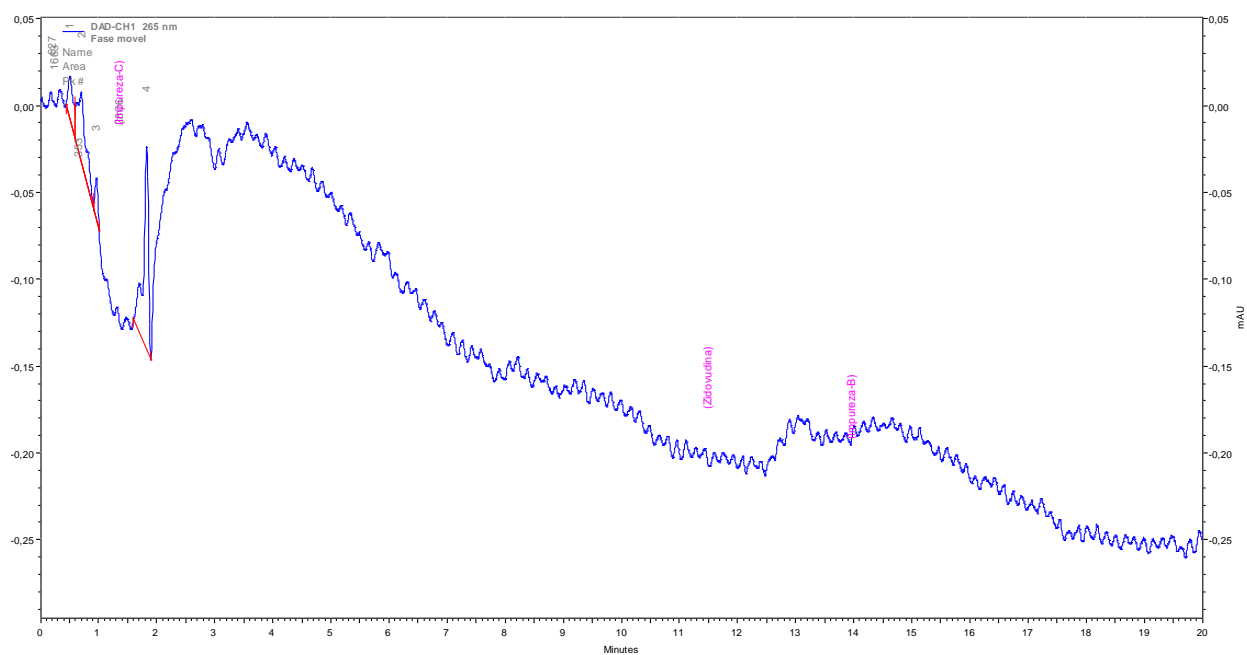
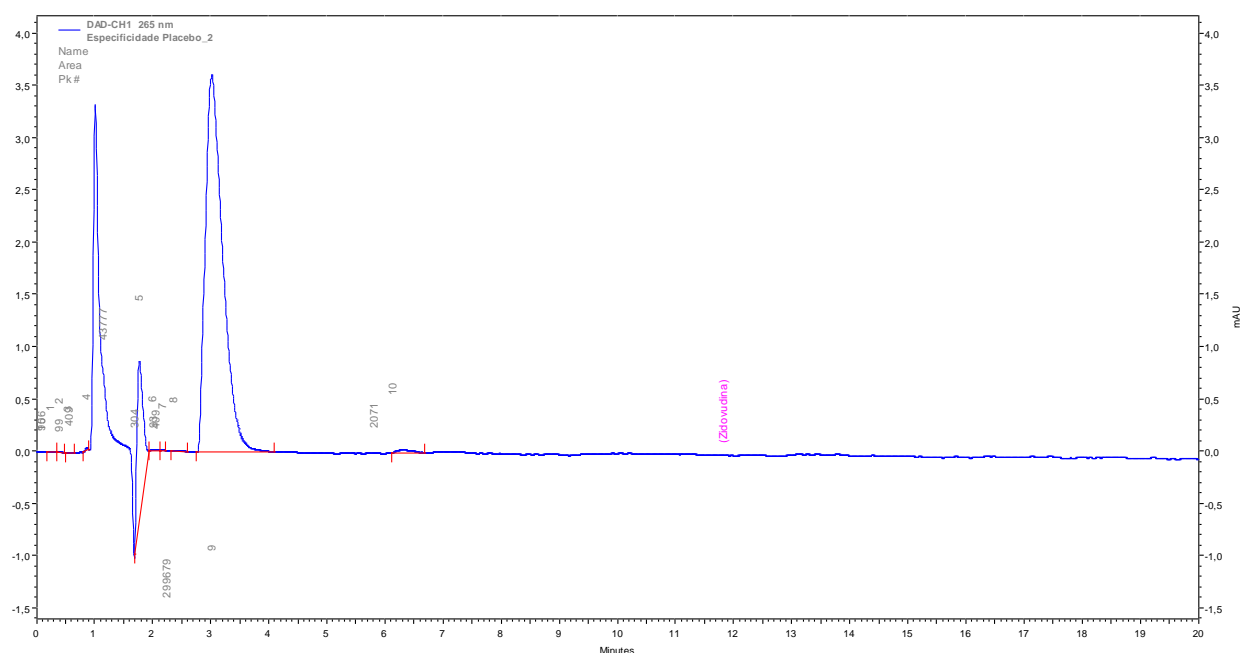
Figura 2 – Cromatograma mostrando o tempo de retenção da zidovudina.**Figura 3** – Cromatograma da fase móvel.

Figura 4 – Cromatograma do placebo do xarope de zidovudina.

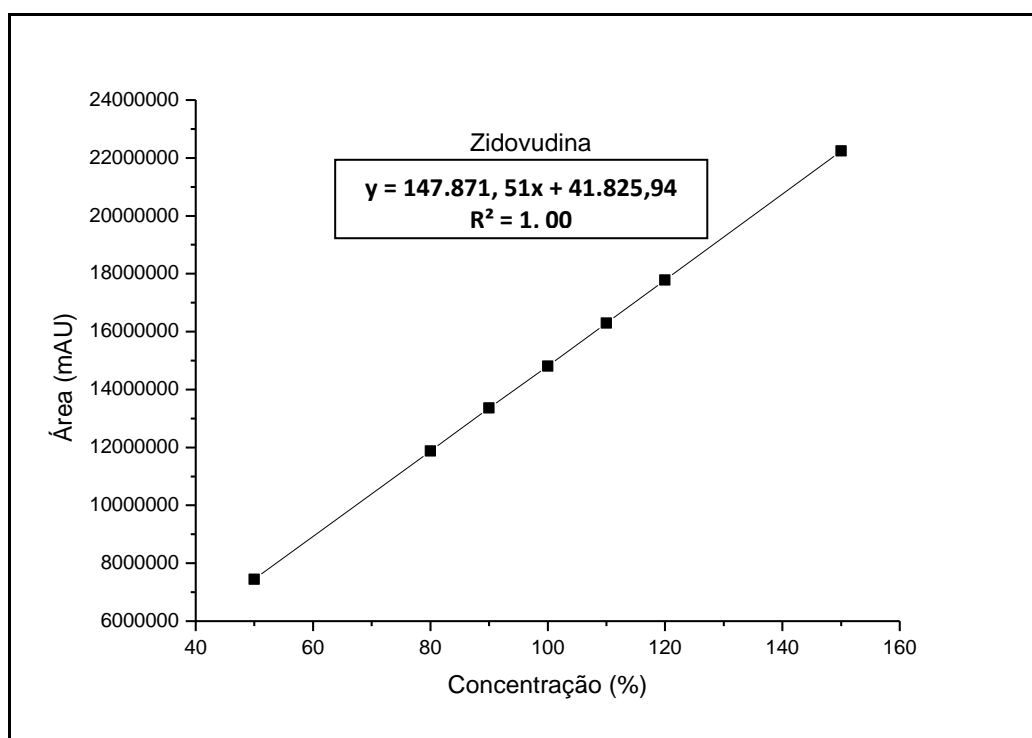


3. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da injeção de 10 μ L de três soluções-mãe de zidovudina em 7 (sete) diferentes concentrações: 50%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% e 150%. As curvas foram tratadas por Análise de Variância (ANOVA), para obtenção da equação da reta.

A figura 5 mostra o gráfico de regressão linear para zidovudina, juntamente com os valores da equação da reta e do coeficiente de correlação (R^2).

Figura 5 – Gráfico de regressão linear do método de doseamento de zidovudina.



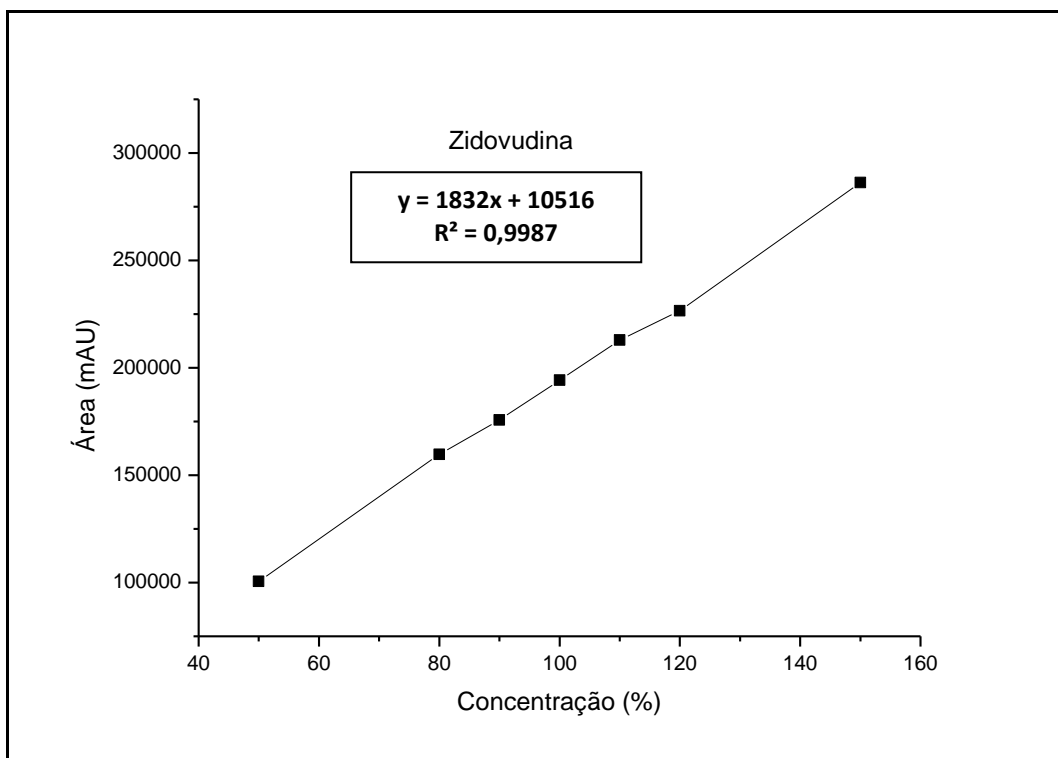
O método demonstrou ser linear para a zidovudina, analisada estatisticamente sob a forma de padrão de matéria-prima através da Análise de Variância (ANOVA), com 95% de confiança, e apresentou valor de coeficiente de correlação (R^2) dentro dos critérios aceitáveis da legislação, que determina um valor mínimo de $R^2 = 0,99$.

5.4.3. Aplicabilidade do método para validação de limpeza

Para verificar se o método poderia ser aplicado na quantificação dos resíduos de zidovudina após o processo de limpeza, foi construída uma curva de linearidade, seguindo os mesmos parâmetros da curva de adequação do método: ela foi construída a partir da análise de três soluções-mãe de zidovudina em 7 (sete) diferentes concentrações (50%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% e 150%), sendo o centro da curva correspondente ao limite de aceitação do resíduo de zidovudina (2,5 µg/mL).

A figura 6 mostra a curva de linearidade para os resíduos do ativo e a equação da reta correspondente.

Figura 6 – Gráfico de regressão linear do método para quantificação dos resíduos de zidovudina.



A Análise de Variância, com 95% de confiança, demonstrou que o método é linear, a curva apresentou valor de coeficiente de correlação dentro dos critérios aceitáveis da legislação, e, portanto, o método é aplicável para quantificação dos resíduos do ativo.

5.5. Teste de recuperação da água de rinsagem

O teste de recuperação da água de rinsagem foi realizado, contaminando-se 6 (seis) placas de inox de 25 cm² com 1 mL de uma solução que continha 12,5 µg/ mL do ativo zidovudina. Coletou-se o resíduo de cada placa, despejando-se 5 mL de água ultrapurificada, para rinsagem de cada uma.

As amostras foram analisadas por CLAE e a quantidade de resíduo foi calculada através da equação da reta obtida pela curva de linearidade para resíduo de zidovudina (Figura 6).

A tabela 8 mostra a correlação entre as concentrações das amostras utilizadas para construção da curva de linearidade e as áreas dos picos apresentadas por cada uma delas. A tabela 9 mostra o fator de recuperação calculado para cada água de rinsagem proveniente das placas contaminadas.

Tabela 8 – Valores das áreas dos picos de zidovudina obtidos na curva controle.

Amostra	%	Concentração (µg/ mL)	Área do pico
1	50%	1,25	100579
2	80%	2,00	159651
3	90%	2,25	175767
4	100%	2,5	194263
5	110%	2,75	212967
6	120%	3,00	226581
7	150%	3,75	286208

Tabela 9 – Fator de recuperação para os resíduos de zidovudina.

Placa	Área	Fator de recuperação (%)	Ativo (µg/mL)
1	186935	96,23	2,41
2	190945	98,29	2,46
3	192702	99,20	2,48
4	192139	98,91	2,47
5	186214	95,86	2,40
6	190605	98,12	2,45
Média	182131,5	93,76	2,44
Desv. Pad.	14650,18	1,40	0,03
CV%	0,08	0,01	0,01

Conforme os Guias Relacionados à Garantia da Qualidade (BRASIL, 2006), é desejável que o fator de recuperação de cada amostra esteja acima de 75% e que a dispersão entre eles não seja acentuadamente elevada.

Observando a tabela 9, verifica-se que o valor médio do fator de recuperação foi de 93,76 % – o equivalente a 2,44 µg/ mL do ativo recuperados da placa contaminada –

com coeficiente de variação 0,01%. Portanto, os resultados obtidos atendem às recomendações estabelecidas pela ANVISA e demonstram que a técnica de rinsagem dos equipamentos é capaz de recuperar de forma eficiente os resíduos de contaminante após o processo de limpeza.

5.6. Determinação da quantidade de resíduo do princípio ativo

Os resultados da quantidade de resíduo do ativo presente nos equipamentos foram obtidos após o processo de limpeza de um lote do xarope de zidovudina, pela amostragem indireta (água de rinsagem) dos equipamentos, realizada com 200 litros de água. As três amostras coletadas de 400 mL foram analisadas por cromatografia líquida, e os cálculos para resíduo do ativo foram realizados pela equação da reta de linearidade para resíduo de zidovudina.

A tabela 10 apresenta os resultados das análises das amostras coletadas para quantificação do resíduo do ativo, mostrando um valor médio de $2,21 \times 10^{-5}$ µg/mL, que corresponde a um valor, aproximadamente, cem mil vezes menor que o limite especificado de 2,5 µg/mL para o resíduo de zidovudina.

Tabela 10 – Quantificação do resíduo de zidovudina após a limpeza dos equipamentos.

Amostra	Área	%	Ativo (µg/mL)
1	1,79336	0,00092	$2,31 \times 10^{-5}$
2	3,35938	0,00173	$4,32 \times 10^{-5}$
3	NQ	NQ	NQ
Média	1,71758	0,00088	$2,21 \times 10^{-5}$
Desv. Pad.	1,37251	0,00071	$1,77 \times 10^{-5}$
CV%	0,79909	0,79909	0,79909

Legenda: NQ – não quantificado

6. CONCLUSÕES

O estudo prévio para validação de limpeza permitiu a atualização dos Procedimentos Operacionais Padrão, que passaram a atender a todas as recomendações descritas no Guia de Validação de Limpeza da ANVISA(BRASIL, 2006).

A verificação do método de quantificação do teor de zidovudina através da análise dos parâmetros de precisão, especificidade e linearidade mostrou a sua adequação às condições atuais de uso do laboratório de Controle de Qualidade do LAFEPE, e, portanto, a capacidade do laboratório de aplicar o método da maneira apropriada.

Através da construção da curva de linearidade, cujo centro correspondia ao limite de quantificação para o resíduo de zidovudina, verificou-se que o método analítico é aplicável para quantificação dos resíduos do ativo após a realização da limpeza.

Os resultados da quantificação do resíduo do ativo apresentaram valores muito menores que o limite especificado para os resíduos de zidovudina, permitindo concluir a eficiência do método em limpar as sujidades do ativo contaminante dos equipamentos.

Desta forma o presente estudo permitiu avaliar se os processos de limpeza dos equipamentos apresentam eficiência para retirar as sujidades do ativo contaminante. Além disso, comprovou a adequação do método de doseamento da zidovudina e a sua aplicabilidade na quantificação do resíduo do ativo após o processo de limpeza.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, J.R.B, et al. Validação de limpeza de equipamentos multipropósitos para formas farmacêuticas líquidas: caso da zidovudina xarope. *Acta Farm. Bonaerense.*, v.25. n. 1, p. 35-42, 2006.

AMARAL, F. D. Análise de riscos e pontos críticos de contaminação microbiana na manipulação de produtos e insumos farmacêuticos. *ICTQ*, 2009.

ANDRADE, S. C. I. Validação de Limpeza de Equipamentos Farmacêuticos. 124f. Dissertação (Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Politécnico de Leiria, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Portugal, 2012. Publicação eletrônica disponível em: https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/743/1/Mestrado%20GQSAalimentar_Ines_Andrade.pdfhttps://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/743/1/Mestrado%20GQSAalimentar_Ines_Andrade.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2014.

AOKI, F. Y. Infecções virais. In: PAGE, M. C.; CURTIS M.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAM, B. B. *Farmacologia integrada*. São Paulo: Manole, p. 445-460, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guias Relacionados à Garantia da Qualidade, 2006. Publicação eletrônica disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb33c500474580fd8d1ddd3fbc4c6735/guias_qualidade.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 jun. 2014.

BRASIL. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre as “Boas Práticas de Fabricação de medicamentos”. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de Abril de 2010. (a)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia brasileira*, volume 2. 5ª ed. Brasília: ANVISA, 2010. (b)

BRASIL. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de Junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Workshop de Validação de Metodologia Analítica, 2012. Publicação eletrônica disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/78a41980425407dba6beaf6d490f120b/Workshop+Anvisa+03-12-2013.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 07 jul. 2014.

FAGUNDES, A. Johnson & Jhonson faz recall de medicamentos no Brasil, 14 de janeiro de 2011. Publicação eletrônica disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibriosaude/2011/01/860983-johnson--johnson-faz-recall-de-medicamentos-no-brasil.shtml>> Acesso em: 05 jun. 2014.

FDA - Food and Drug Administration. Validation of cleaning processes (7/93): Guide to inspections validation os cleaning processes, 1993. Publicação eletrônica disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074922.htm>> Acesso em: 03 jul. 2014.

FONSECA, T. I. M. Controlo de Qualidade Microbiológica na Indústria Farmacêutica. 123f. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde) – Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, 2012.

GOMES, M. L. P; SOUZA, S.V.C. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilâmicos. Quim. Nova, v. 33, n. 4, p. 972-977, 2010.

HAIDER, S. I., ASIF, E. S. Cleaning validation manual: a comprehensive guide for pharmaceutical and biotechnology industries, 2010. Publicação eletrônica disponível em: <http://www.lybrary.com/catalogues/catalog_182.pdf> Acesso em: 05 jul. 2014.

INMETRO DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre Validações de Métodos de ensaios Químicos. RJ, Brasil, 2003.

KLINKENBERG, R.; STREEL, B.; CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. J. pharm. biomed. anal. v.32 p. 345-352, 2003.

MAGESTE, J. O. et al. Estudo da microbiota fúngica anemófila de uma indústria farmacêutica em Juíz de Fora – MG. Revista FACIDER, v.1, n.1, 2012. Disponível em: < <http://sei-cesucol.edu.br/revista/index.php/facider/article/view/20/48>>. Acesso em: 07 jul. 2014.

MERCK, Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ, EXTRAN MA 02 NEUTRO, 2012. Publicação eletrônica disponível em: <http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/chemicals/extran-ma-02_MDA_CHEM-107553> Acesso em: 08 jul. 2014.

MILENOVIC, D. M. et al, Validation of an HPLC Method for Analysis of Nifedipine Residues on Stainless-Steel Surfaces in the Manufacture of Pharmaceuticals, A Chrom., v.20, n.2, p. 183-194, 2008.

MINGORANCE, J. Sistema de Validação de Limpeza (Parte I). Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, 2005. Disponível em:
< http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2019/19validacao_p1.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2014.

MINGORANCE, J. Sistema de Validação de Limpeza (Parte II). Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, 2005a. Disponível em:
< [http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2020/20ValidLimp\(parte2\).pdf](http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2020/20ValidLimp(parte2).pdf)>. Acesso em: 05 jul. 2014.

OLIVEIRA, A. T. C. Estratégia para validação de limpeza de equipamentos e ambiente ocupacional da área de produção de antirretrovirais. 135f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

PERES, L. C. Alguns aspectos técnicos sobre a validação de limpeza. Fármacos e medicamentos, Eb. Brasileira, p. 20-23, Novembro/ Dezembro, 2010.

PINTO, T. J. A. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. ed. 3, São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 2010.

PORTUGAL. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. Farmacopeia portuguesa VIII. Lisboa. INFARMED, 2005.

VALENTINI S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. Arq. Mudi. , v.11, n.2, p. 26-31, 2007.

VEAL, G. J, BACK, J. D. Metabolism of zidovudine. Gen. Pharmacology, v.26, n, 27, p. 1469 -1475, 1995.

USP (THE UNITED STATES PHAMACOPEIA). Crhomatography, 27 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004, p. 2272-2284.

YUGUE, V. C. Validação de processos farmacêuticos; Fármacos & Medicamentos, Ano 1, n.2, p.40-44, Jan/Fev 2000.